Feel so Bio 19キットシリーズ

#008 DNA鑑定 キット

取扱説明書

ver.1.3

コスモ・バイオ株式会社

目次

本キットの特徴	… 2
キット使用時に必要な試薬・機材等の一覧	… 3
内容物について	… 4
分注について	… 5
DNAについて	… 6,7
制限酵素について	… 8
DNA鑑定について	… 9,10
アガロースゲル電気泳動の原理	… 11-13
実験手順	… 14-16
DNA染色の推奨方法	… 17
付録1　電気泳動法	… 18
付録2　予想されるバンド	… 19

本キットの特徴

本キットは、DNAの塩基配列の違いを制限酵素処理によって検出するキットです。

現在、制限酵素を用いたDNA鑑定の手法は生物学の研究のみならず、犯罪捜査や親子鑑定、考古学の分野など幅広い分野で応用され、バイオテクノロジーの中でも最もよく知られている技術の一つです。

本キットを通じて、DNAや制限酵素の化学的性質を学び、さらにバイオテクノロジーの応用技術について興味を持つきっかけを得ることができます。

キット使用時に必要な試薬・機材等の一覧

キット内容（生徒20名（4人1組）分）

・DNAサンプル1	(100μl)	1本
・DNAサンプル2	(50μl)	1本
・DNAサンプル3	(50μl)	1本
・制限酵素　*Hind*Ⅲ	(30μl)	1本
・制限酵素バッファー	(30μl)	1本
・精製水	(30μl)	1本
・ローディングバッファー	(70μl)	1本
・DNAマーカー	(60μl)	1本
・40倍濃縮電気泳動バッファー	(25ml)	1本
・アガロース	(2g)	1袋
・マイクロチューブ	(50本)	1袋
・取扱説明書　（本書）		1冊

本キット以外に必要な試薬・機材一覧

・マイクロピペット	20μL用	5本（各班1本）
	200μL用	1本（分注用）
・マイクロピペット用チップ		6箱（各班1個及び予備）
・電気泳動槽		1～2個
ミニゲルを2個泳動できる個数をご用意下さい。		
・37℃恒温槽		
・DNA染色液		適量
株式会社アドバンス社のMupid Blueを推奨しています。		
（Mupid Blueを用いた染色法はp17に記載しました。）		
・染色用タッパー		5個（各班1個）
・脱色用タッパー		5個（各班1個）

※キットに含まれる電気泳動関係の試薬の量は、株式会社アドバンス社の　電気泳動槽、Mupid Sの使用を想定しております。

※機材につきましては弊社で取り扱っております。ご入用の際にはお問合せ下さい。

内容物について

DNAサンプル1，2，3

シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）のゲノムDNAの一部分をPCRによって増幅したDNAサンプルです。DNAサンプル1は倍量含まれていますので、授業の流れに沿って犯人を当てるゲームなどとしてお使いください。分解を防ぐ目的でTEバッファーに溶解してあります。必ず氷上で融解し、使用時も氷上に静置してマイクロチューブを温めないようご注意ください。また、使用後は速やかに-20℃に戻し、保存してください。

制限酵素

Haemophilus influenzae Rd.由来の制限酵素*Hind*Ⅲです。酵素は常温では短時間で失活しますので、**必ず-20℃にて保存してください**。制限酵素は使用時には必ず氷上に置き、チューブを温めないようにご注意ください。使用後は速やかに-20℃に戻し、保存してください。本酵素は、37℃で最も高いDNA切断活性を示します。

制限酵素バッファー

制限酵素*Hind*Ⅲが最も高いDNA切断活性を発揮するように調製されたバッファーです。-20℃にて保存してください。10倍に濃縮されておりますので、反応溶液の1/10量を使用ください。

＜組成＞Tris-HCl 6mM、MgCl2 6mM、NaCl 100mM、DTT 1mM、
（37℃におけるpHは7.5）

精製水

DNA分解酵素、RNA分解酵素が含まれていない精製水です。-20℃にて保存してください。

アガロース

核酸、タンパク質などの生体高分子を完全に除去した精製アガロースです。高温多湿をさけ、常温にて保存してください。

ローディングバッファー

DNAサンプルをアガロースゲルにアプライする際に使用します。常温にて保存してください。色素を含むため、手や衣服につくと落ちにくいので、取り扱いには十分にご注意ください。

40倍濃縮電気泳動バッファー

40倍の濃度に濃縮したTAE（トリス-酢酸-EDTA）バッファーです。アガロースゲルの作成および、DNAサンプルをアガロースゲル電気泳動法により分離する際の泳動バッファーとして使用します。4℃にて保管してください。電気泳動用バッファーとして使用の際は、精製水で40倍に希釈してご使用ください。

※内容物が微量なため、マイクロチューブの蓋についていることがございます。その際には、手で振ってマイクロチューブの底に溶液を集めてからご使用ください。

分注について

班構成

本実験キットでは4人1班（実験は2人一組）を推奨しています。

機材一班分

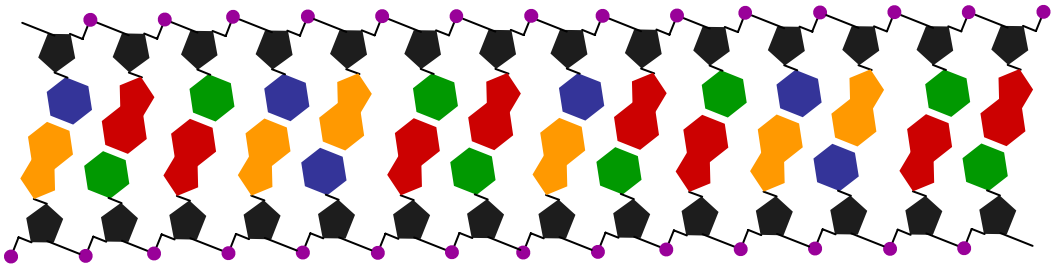
DNAサンプル1，2，3	…10μL
DNAサンプル1，2，3	…各10μLずつ
制限酵素　*Hind*Ⅲ	…3μL
制限酵素バッファー	…3μL
精製水	…3μL
ローディングバッファー	…12μL
DNAマーカー	…10μL
ミュービッドブルー	…30mL
40倍濃縮電気泳動バッファー	…100mL※（40倍希釈後）
アガロース	…1個

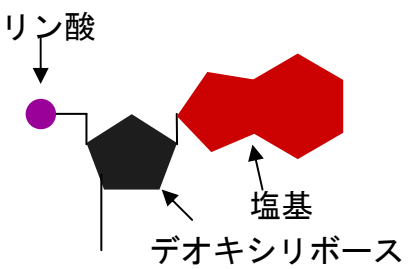
※内容物のご説明と取扱いの項、及び実験手順の項に従って試薬を溶解して
ください。

DNAについて

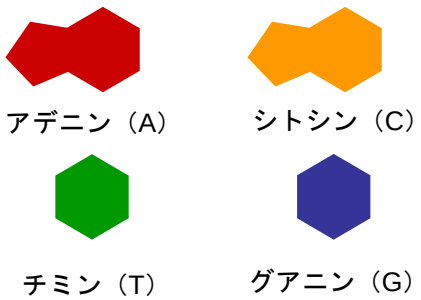
DNAの構造

DNAは、デオキシリボ核酸（Deoxyribo Nucleic Acid）の略で、リン酸、デオキシリボースという五炭糖、塩基からなるヌクレオチドという分子が連なった、生体高分子です。下図は、DNAの構造を簡単に表した図です。





ヌクレオチド



4種類の塩基

塩基にはアデニン・チミン、グアニン・シトシンの4種類があり、それぞれA・T・G・Cと略されています。このうち**A**と**T**、**G**と**C**は水素結合とよばれる弱い結合で結ばれる性質を持っています。図を見ると、**A**と**T**、**G**と**C**がお互いに結合しあっているのが分かります。このようにして、ヌクレオチドが結合しあって鎖状になった構造が2本向かい合い、いわゆる「二重らせん」といわれる構造となるのです。

DNAの働き

DNAはヌクレオチドが連なった構造を持つこと、塩基に4種類あることは、DNAの働きを考える上で非常に重要です。

それは、DNAの塩基の並び方（塩基配列）が、体の構成や物質の代謝などを行うタンパク質の構造を決めているためです。タンパク質は、20種類のアミノ酸が連なり、アミノ酸同士の化学的性質によって複雑な構造をとっています。DNAの塩基配列は、このアミノ酸の並び方を決定しています。

DNAの塩基配列 → アミノ酸の並び方 → タンパク質の構造

塩基配列がアミノ酸の並び方を決定する方法は、暗号解読に良く似ています。下の表のように、3つの塩基でひとつのアミノ酸を決定しており、そのアミノ酸が結合することで、タンパク質がつくられます。

1番目の塩基		2番目の塩基								3番目の塩基
		T		C		A		G		
T		TTT	フェニルアラニン	TCT	セリン	TAT	チロシン	TGT	システイン	T
		TTC		TCC		TAC		TGC		C
		TTA	ロイシン	TCA		TAA	－	TGA	－	A
		TTG		TCG		TAG		TGG	トリプトファン	G
C		CTT	ロイシン	CCT	プロリン	CAT	ヒスチジン	CGT	アルギニン	T
		CTC		CCC		CAC		CGC		C
		CTA		CCA		CAA	グルタミン酸	CGA		A
		CTG		CCG		CAG		CGG		G
A		ATT	イソロイシン	ACT	トレオニン	AAT	アスパラギン酸	AGT	セリン	T
		ATC		ACC		AAC		AGC		C
		ATA		ACA		AAA	リジン	AGA	アルギニン	A
		ATG	メチオニン	ACG		AAG		AGG		G
G		GTT	バリン	GCT	アラニン	GAT	アスパラギン	GGT	グリシン	T
		GTC		GCC		GAC		GGC		C
		GTA		GCA		GAA	グルタミン	GGA		A
		GTG		GCG		GAG		GGG		G

しかし、DNAの塩基配列のすべての領域がタンパク質の構造（アミノ酸の並び）を決定しているわけではありません。実際にタンパク質の構造を決定するのはDNA上の「遺伝子」とよばれる領域のみです。ヒトの場合、DNAは30億塩基対ですが、その中に遺伝子領域が2万箇所程度存在すると考えられています。

制限酵素について

制限と制限酵素

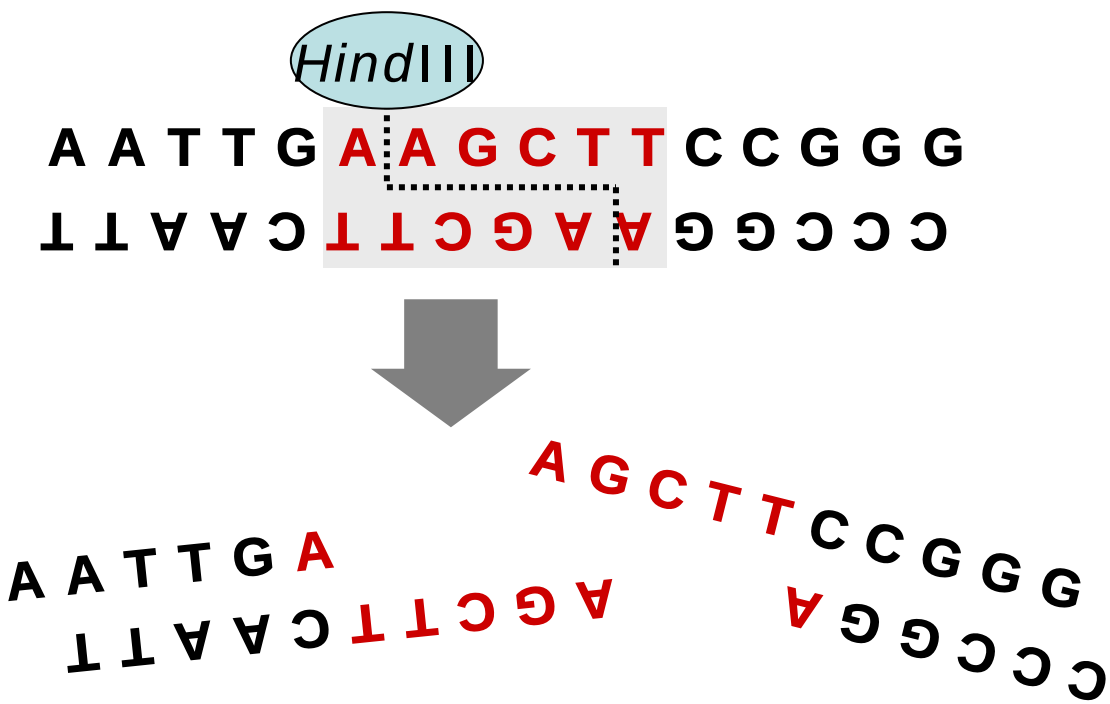
細菌は自分以外のDNAを切断・分解することで、ウイルスやファージなどの外から侵入してくるDNAを排除しています。この外来DNAの排除メカニズムは「制限」と呼ばれています。制限で中心的な役割をする酵素が「制限酵素」です。制限酵素は特定のDNAの配列を認識して切断することが知られています。

本キットでは、*Haemophilus influenzae* Rd.が持っている制限酵素を用いてシロイヌナズナのゲノムDNAから増幅した断片配列を切断します。

制限酵素の性質

制限酵素は、特定のDNAの配列を認識し切断する酵素です。大部分の制限酵素は4塩基、6塩基または8塩基の、特定のDNAの配列を認識し、切断します。

制限酵素の大きな特徴は、その認識するDNAの配列がパリンドローム（回文）構造をとっていることです。パリンドローム構造とは、「シンブンシ（新聞紙）」のように前から読んでも後ろから読んでも同じことを指しますが、2本鎖のDNAにおけるパリンドローム構造とは下図のような配列（灰色四角）を指します。本キットで用いる制限酵素*Hind* IIIは下図のパリンドローム配列（赤字）を認識して特定の箇所（点線の部分）で切断します。



DNA鑑定について

DNA塩基配列の違い（多型）

遺伝暗号である塩基配列（ATGCの並び方）は、生物種間で大きく異なりますが、種内においても塩基配列は少しずつ異なっており、これを多型と呼びます。この多型を検出する方法が、DNA鑑定です。ここでは、3つのタイプの代表的な多型を説明します。

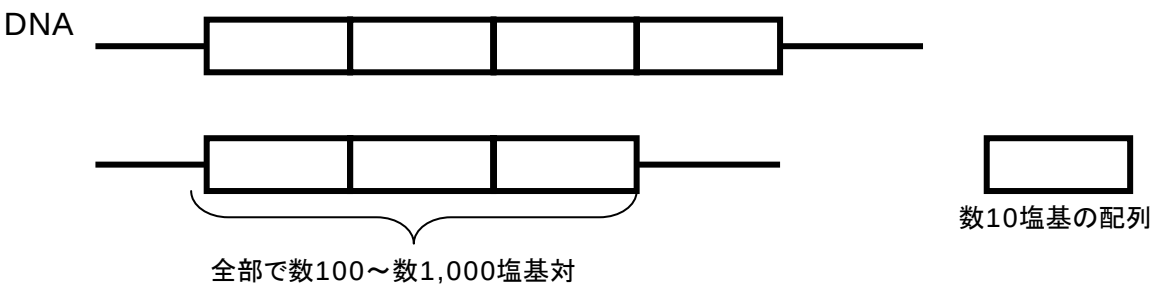
①SNP（Single Nucleotide Polymorphism、一塩基多型）

通常、スニップと発音されます。個体間において、塩基配列の並びが一文字違う部分のことで、数百～数千塩基に一カ所の割合で存在していると考えられており、ヒトDNA全体では300万～1000万個存在するとされています。

この多型は、DNA上に多数存在すること、判定が容易で、結果を（0，1）で信号化することができることから、多型として利用しやすく、21世紀型多型マーカーとして研究が進んでいます。

②VNTR（Variable Nucleotide of Tandem Repeat）

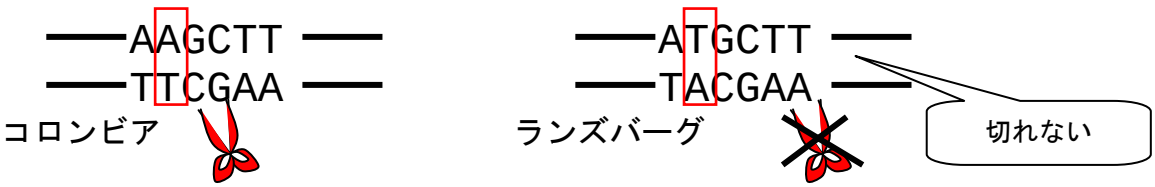
ミニサテライトとも呼ばれ、数十塩基を1単位とする繰り返し配列が、全体で数100～数1,000塩基続いている部分のことです。繰り返しの回数が個人によってちがうので、長さを比べることで、個人の配列の違いを見ることができます。



③マイクロサテライト（Microsatelite）

VNTRよりも短い繰り返し配列のことです。2～6塩基の繰り返し配列が、全体で100～300塩基続いています。ここもまた個人によって繰り返しの回数が異なります。このような部分がヒトDNA全体に数万個ほど存在しています。

本キットは、植物のモデルとして世界中で研究されている植物であるシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）のSNPを、制限酵素によって切断できるかできないかによって検出するものです。
シロイヌナズナは、その産地によっていくつかのタイプに分けられており、本キットでは、そのなかでもコロンビアおよびランズバーグと呼ばれる品種のDNAを使用しています。
シロイヌナズナのG4711と呼ばれる位置は、ランズバーグ株のDNAでは制限酵素HindⅢによって切断される一方、コロンビア株のDNAでは切断されません。



このSNPを利用し、G4711の周辺約1,500塩基をPCRによって増幅したのちに、この断片をHindⅢで処理することで、コロンビアとランズバーグを判別することができます。
また、シロイヌナズナの核には2セットのゲノムDNAがあるため、コロンビアとランズバーグを掛け合わせた品種では、HindⅢによって切断される断片と切断されない断片ができます。
本キットでは、DNAサンプル1をコロンビアから、DNAサンプル2をランズバーグから、DNAサンプル3をコロンビアとランズバーグを掛け合わせたものから作成しており、それぞれの多型を検出することができます。

＊リバネスの実験教室では、それぞれを架空の事件、犯人から作成したDNAサンプルとして、ゲーム性を持たせたものにしています。

アガロースゲル電気泳動の原理

アガロース電気泳動法とは

アガロース電気泳動法は、DNAやRNAなどの核酸をそれらの電気的な性質を利用して分離する方法です。核酸は「－」の電荷を帯びているため、電場に置かれると、アガロース（※）のゲルの網目構造内を＋極側に移動します。長いDNA断片は網目構造内をゆっくりと（引っかかりながら）動くのに対して、短いDNA断片はより速く（あまり引っかからずに）動くことから、アガロースゲル電気泳動法では、DNA断片を長さによって分離することが可能です。この方法はバイオテクノロジーの研究においてDNA断片の際に用いられる最もポピュラーな方法であり、現在のバイオテクノロジーを支える最も基本的な技術です。

※アガロースとは？

アガロースとは、「寒天」の主要な成分のことです。二種類の糖が結合しあって網目状の構造をとることから、生体高分子、特にDNAの分子量を分析する際によく利用されます。

DNAの電気的性質

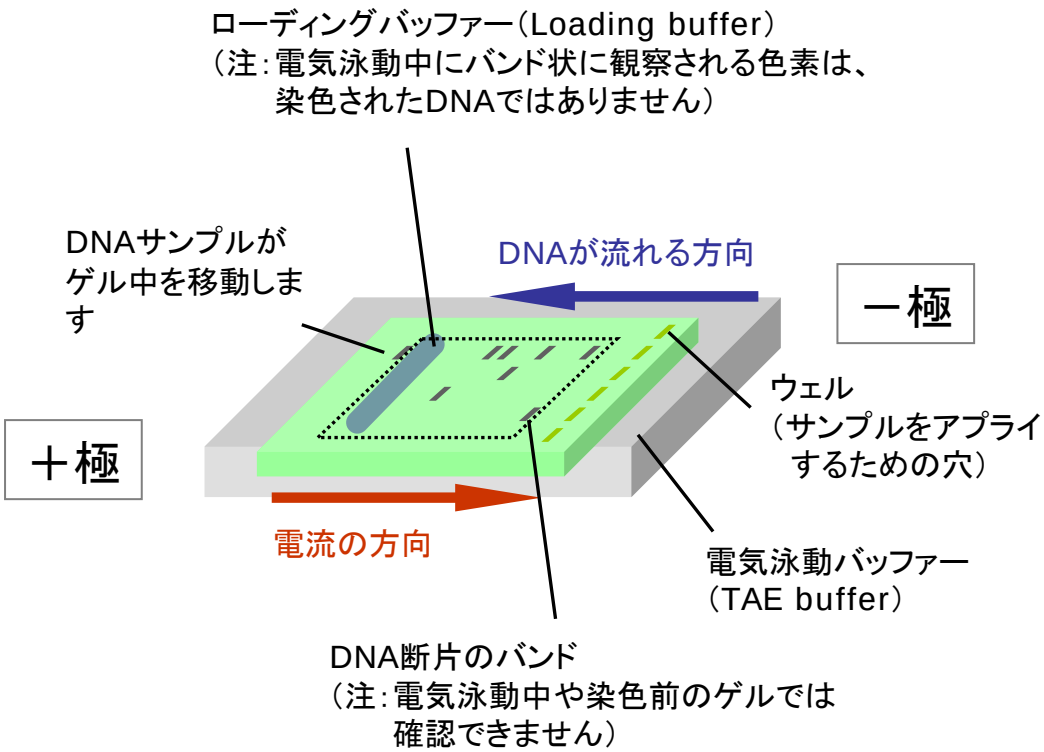
DNAは、リン酸基・塩基・デオキシリボース（糖の一種）によってできる「ヌクレオチド」とよばれる分子が直鎖状につながった構造をとっています。このうちリン酸基と塩基が荷電しています。

DNAの場合、塩基の荷電は二重鎖構造をとるために打ち消されているので、水溶液中ではリン酸基のみが荷電しており、したがってDNAはヌクレオチド数、すなわち分子量（※）に比例した電荷を持っていることになります。これはDNAの電気的な性質で最も重要な点です。

※DNAはヌクレオチドが直鎖状につながった構造をとるため、分子量はそのヌクレオチド数に比例します（塩基の種類によって多少の誤差が生じます）。一般的にDNAの大きさは分子量で表わさずヌクレオチドの長さ（塩基対数、base pair：bp）で表わします。

アガロースゲル電気泳動法では、このようなDNAの電気的な性質を利用します。アガロースによるゲルマトリックス（アガロースゲル）内に電圧をかけることで電場を生じさせ、DNA断片を長さ（単位は塩基対を意味するbp：base pair）によって分離します。DNAは二重らせんとよばれる単一な構造をとっているため、DNAは分子量による移動度の差によって分離することができます。

下の図は、アガロースゲル電気泳動の模式図を示しています。アガロースゲル電気泳動を行う際には、サブマリン電気泳動槽とよばれる機器を使用します。まず電気泳動槽を、導電性でかつDNAの分解が起こりにくいTAEバッファーで満たし、TAEバッファー中にアガロースゲルを静置します。アガロースゲルには、ウェルとよばれるサンプルを注入（アプライ）するための穴があり、ここにDNAサンプルをマイクロピペットを用いてアプライします。DNAサンプルのアプライ後のゲルに電圧をかけ電流を流すことでDNA断片をサイズによって分離することができます。



DNAサンプルを電気泳動する際には、あらかじめDNAサンプルをローディングバッファーと混和します。これによりDNAサンプルは、泳動バッファー中に拡散することなく、ウェル内にアプライすることが可能となります。ローディングバッファーには、電気泳動中にサンプルの移動度の目安となる色素や、ウェルにDNAサンプルを沈ませるためのグリセロールなどが含まれています。

あらかじめDNA断片のサイズの分かっているDNAサンプルを「DNAのモノサシ」として隣のレーンに電気泳動することで、未知のサンプルの分子量を検討することも可能です。

電気泳動の終了後は、DNA断片を可視化するために染色します。DNA染色に用いられる試薬としては、エチジウムブロマイド（EtBr）、Mupid Blueなどが挙げられます。EtBrは検出感度に優れていますが、DNAの二重鎖の間に入り込む（インターカレーションする）物質であり、発がん性が認められます。また、DNA断片のバンドの観察の際に紫外線ランプが必要となるため、ビニール手袋を必ず着用し、防護メガネを使用するなど、取扱いには十分な注意が必要です。本キットでは、安全なMupid Blueの使用を推奨します。

電気泳動の準備と手順

実験の手順（実験前に準備していただくこと）

① 電気泳動バッファーの作成

40倍濃縮泳動バッファーを975mLの精製水で40倍に希釈します。キットで使用を推奨している電気泳動層、Mupid-Sでは電気泳動バッファーを約100mL/台　使用します。

② アガロースゲルの作成

1）300mLの三角フラスコに1.4gのアガロースを入れ ①で作成した1xTAEバッファー200mLを加えよく混ぜます。三角フラスコの口をラップで軽く閉じ電子レンジで加熱してアガロースを完全に融解させます。この作業はアガロースの粒子が見えなくなるまで行ってください。加熱の際は、沸騰による噴出に注意してください。なお、この作業は突沸した水蒸気が手にかかるなどやけどの危険性がありますので、必ず軍手の上にビニール手袋をして作業を行ってください（**この作業はやけどの危険があります。必ず指導者が行うようにしてください**）。

2）溶解させたアガロースは、電気泳動槽付属のゲルメーカーを用いて成型します。②で融解したアガロースを、ある程度（50℃程度）まで冷ました後、ゲルメーカーに流し込み、上からウェルを作成するためのコームを差し込みます。アガロースが固まるまで上からアルミホイルで覆い、静置してください。

※200mLのアガロース溶液で、小さいゲルが約8枚、大きなゲルでは4枚作成できます。ゲルメーカーが一個しかない場合で、小さいゲルを4枚以上作成したいときには、1）のステップで、0.7gのアガロースを100mlの泳動バッファーに溶かすなどして、小分けにゲル作成を行なってください。また、一度固まってしまったゲルでも、再度レンジで温めることで溶解し、ゲルを作成することが可能です。

作成したアガロースゲルは、希釈後の泳動バッファーに浸した状態で一ヶ月程度常温保存が可能です。また、使用前にはウェルの底に穴が開いていないことを目視で確認してください。

実験手順

実験本番の手順（制限酵素処理）

1）恒温槽を37℃にセットします。

2）氷上でDNAサンプル、制限酵素バッファー、精製水を融解させます。

3）マイクロチューブに制限酵素バッファー 1μl、DNAサンプル 8μlを入れ、マイクロピペットで均一に混ぜあわせます。DNAサンプル1を入れたものには①、DNAサンプル2を入れたものには②、DNAサンプル3をいれたものには③と記入します。

4）3）で作成した混合溶液を氷上で5分間、静置してください。

5）各班で作成したマイクロチューブに*Hind*Ⅲ 1μlを加え、それぞれの混合溶液が均一になるようマイクロピペットで混ぜあわせてください（**注：*Hind*Ⅲを入れたマイクロチューブは、必ず氷上に置いて作業してください。使用後は速やかに-20℃へ移動してください**）。

6）フローターにチューブをさし、37℃の恒温槽へ移して60分間静置してください（注：室温でも酵素反応は可能ですが、酵素の活性が弱くなるため切断が不完全になったり、切断の確認が難しくなる可能性がありますのでご了承ください）。

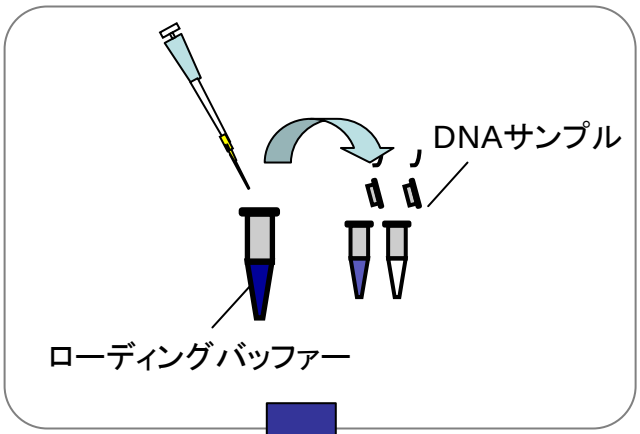
実験の手順

① 電気泳動槽の準備

電気泳動槽に電気泳動バッファーを加え、電気泳動槽内のマイナス極側にウェルが来るようにアガロースゲルをセットします。アガロースゲルのウェルが必ず電極と平行になるようにセットしてください。使用する電気泳動バッファーの量は、電気泳動槽によって異なりますので、電気泳動槽の取扱説明書に従い、適切な量をご使用ください（参考：Mupid-Sでは約100mL程度）。

② DNAサンプルの調整

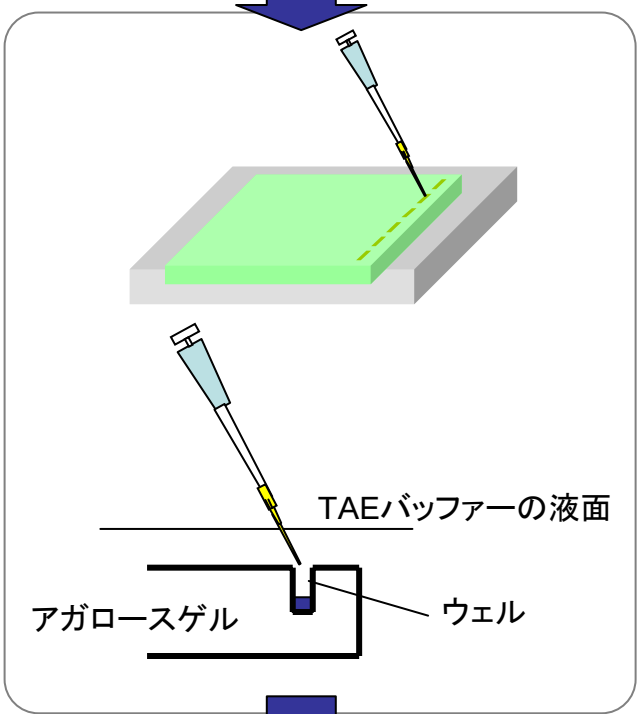
本キット添付のローディングバッファーを2μLずつ制限酵素処理の終了したチューブに加えよく混ぜます（合計12μL）。DNAマーカーには2μLのローディングバッファーを加えてよく混ぜてください。



③ DNAサンプルのアプライ

DNAサンプルを別々のウェルにアプライします。

アプライは、右図のようにチップの先をウェル内まで入れないようにします。チップの先端でウェルを破壊しないよう、細心の注意を払ってください。

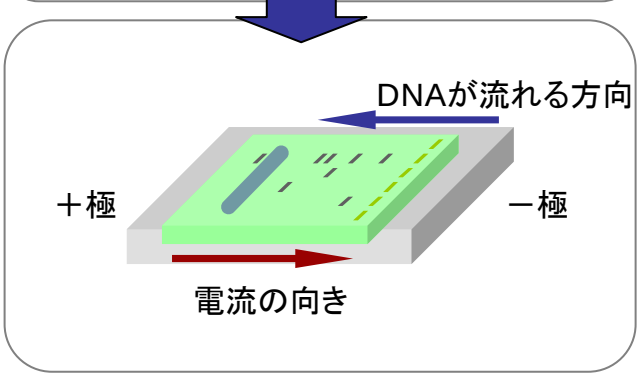


④ アガロース電気泳動

電気泳動槽の電源スイッチを入れ、電気泳動を開始します。DNAはマイナスの荷電を持っていますので、プラス極側に移動します。くれぐれも感電にご注意ください（参考：Mupid-Sでの電気泳動条件は100ボルトで20分程度となります）

⑤ アガロースゲルの染色

次ページ「DNA染色の方法」をご覧ください。



DNA染色の推奨方法

＜Mupid Blueを使用したDNA染色法＞

Mupid Blue

50倍に濃縮されたDNAの染色液です。電気的性質によってDNAと結合することで青色を呈するため、電気泳動の結果を確認することが可能です。インターカレーション型と呼ばれる染色液と異なり、発がん性がなく安全な試薬です。常温にて保存し、使用の際は精製水にて50倍に希釈してご使用ください。

DNA染色液による染色では脱色の操作が必要となります。脱色の操作では精製水を用います。

※ DNA染色液は無害ですが色素を含んでおり、衣服・皮膚などに付くと汚れますので取扱いの際にはビニール手袋・白衣等を着用することをお勧めします。

① DNA染色液を精製水で50倍希釈し、タッパーに入れる。脱色用の水をタッパーに用意しておく。

② 電気泳動の終わったアガロースゲルをDNA染色液のタッパーに入れ、2分間ゆっくりと手で振盪する（2分以上染色を続けると脱色がきれいにできなくなりますので、時間を厳守してください）。

⑤ 精製水にアガロースゲルを移し、DNA断片のバンドが確認できるまで精製水を交換しながらゆっくりと手で振盪する。

⑥ 観察（デジタルカメラ等でアガロースゲルを撮影することが可能です。

付録1　電気泳動法

泳動バッファー

DNAの電気泳動では、一般にTAE bufferやTBE bufferが用いられます。TAE bufferは数kb以上の比較的長いDNA断片の分離に適しているのに対して、TBE bufferはそれよりも短いDNAの分離に適しています。

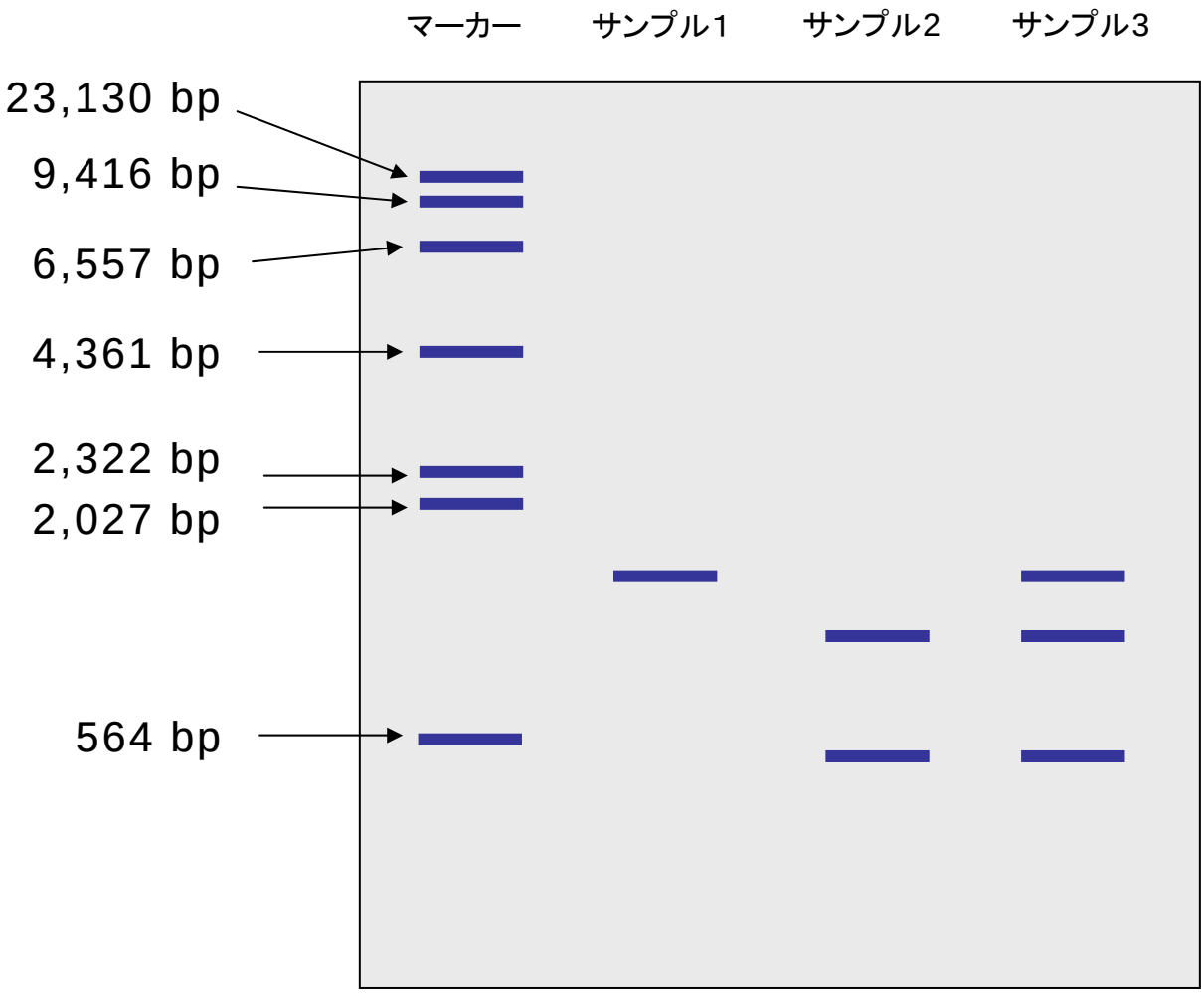
アガロースゲルの濃度

電気泳動法によるDNAの分離実験では、ゲルの作成の際のアガロースの濃度が非常に重要となります。アガロースの濃度が上がれば上がるほどゲルマトリックス分子とDNA断片の相互作用は強くなりDNA断片の移動度が小さくなるため、より細かいDNA断片の分離が可能となります。分離したいDNA断片の長さによって適当なアガロース濃度を選択することが大切です。本キットでは、0.7%のアガロースゲルを使用することを推奨しています。

アガロース濃度 (%)	分離できるDNA断片の長さ (bp)
0.6	1,000~20,000
0.7	800~10,000
1	500~7,000
1.2	400~6,000
1.5	200~3,000
2	100~2,000

付録2　予想されるバンド像

*Hind*Ⅲ はDNA断片のうちAAGCTTという配列を認識し、切断します。このDNA配列は、DNAサンプル1にはなく、DNAサンプル2には1箇所存在しています。DNAサンプル3には、このDNA配列が1箇所存在する断片と存在しない断片の両方が含まれています。0.7％アガロースゲルによって25分間DNA電気泳動を行うと、下図のような結果となることが予想されます。



ご使用上の注意

本製品は、バイオ教育を目的として開発されたキットです。本取扱説明書に記載されたプロトコル以外での使用につきましては、保証の限りではございません。

商品のご返品について

商品のご返品につきましては、弊社の確認を必要とさせていただきます。この確認なしでのご返品はご遠慮ください。適切な保存、ご使用をされていない製品についてはご返品をお受けできない場合がございます。また、品質保持のために返品された製品を再販することは一切ございません。

カスタマーサポート

Feel so Bioシリーズ　カスタマーサポート係
TEL：03-6277-8041
FAX：03-6277-8042
Mail：info@feelsobio.net

※FAXをご利用の場合は、同封のFAX用紙にご記入の上ご送信ください。

製造・販売元

株式会社リバネス http://www.leaveanest.com

〒160-0004
東京都新宿区四谷2-8 藤井ビル5F
TEL 03-6277-8041
FAX 03-6277-8042

販売

コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016　東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
TEL：(03) 5632-9610　FAX：(03) 5632-9619
e-mail：mail@cosmobio.co.jp
URL：http://www.cosmobio.co.jp/